

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Am

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-219978

(43) 公開日 平成5年(1993)8月31日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 19/34	Z	7432-4B		
C 1 2 N 9/12		7823-4B		
9/78		7823-4B		
15/54				
		8931-4B	C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数10(全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平4-27903

(22) 出願日 平成4年(1992)2月14日

(71) 出願人 000006770

ヤマサ醤油株式会社

千葉県銚子市新生町2丁目10番地の1

(72) 発明者 野口 利忠

千葉県銚子市西小川町4399番地6号

(72) 発明者 丸茂 剛

千葉県銚子市末広町1番地12号

(72) 発明者 奥山 潔

千葉県銚子市新生町2丁目2番地1号

(72) 発明者 緑川 祐一朗

千葉県銚子市海鹿島町5201番地7号

(74) 代理人 弁理士 浅村 皓 (外3名)

(54) 【発明の名称】 核酸関連物質の酵素的製造法及びそれに使用する酵素調製物

(57) 【要約】

【目的】 核酸関連物質を酵素的に製造する方法、及びその製造法に使用する酵素調製物が提供される。

【構成】 ポリヌクレオチドあるいはイノシン、2' , 3' -ジデオキシイノシンなどの核酸関連物質の製造に不可欠な酵素、例えばポリヌクレオチドホスホリラーゼあるいはアデノシンデアミナーゼなどを組換えDNA手法により微生物内で大量に調製し、該微生物から得られる酵素調製物を用いて核酸関連物質を製造することにより、ポリヌクレオチドあるいはイノシン、2' , 3' -ジデオキシイノシンなどの核酸関連物質を大量にかつ工業的に有利に製造することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の工程からなる核酸関連物質の酵素的製造法。

(A) 合成目的の核酸関連物質の製造に不可欠な酵素の遺伝子をクローニングし、該遺伝子の発現が高効率で起こるように適当な発現制御シグナルと連結して発現ベクターを構築する工程；

(B) A工程で得られたベクターを用いて微生物を形質転換する工程；

(C) B工程で得られた形質転換体を当該微生物が増殖可能な培地中で増殖させ、さらにクローニングした酵素の遺伝子の発現を誘導して合成目的の核酸関連物質の製造に不可欠な酵素が菌体内に大量に蓄積するまで培養を行う工程；

(D) C工程で培養を終えた菌体を回収し、合成目的の核酸関連物質の製造に不可欠な酵素を抽出、精製して酵素調製物を調製する工程；および

(E) D工程で得られた酵素調製物を用いて合成目的の核酸関連物質を製造する工程

【請求項2】 合成目的の核酸関連物質がポリヌクレオチドであり、該核酸関連物質の製造に不可欠な酵素がポリヌクレオチドホスホリラーゼである、請求項1記載の製造法。

【請求項3】 合成目的の核酸関連物質がイノシンまたはその誘導体であり、該核酸関連物質の製造に不可欠な酵素がアデノシンデアミナーゼである、請求項1記載の製造法。

【請求項4】 合成目的の核酸関連物質が2', 3'-ジデオキシイノシンであり、該核酸関連物質の製造に不可欠な酵素がアデノシンデアミナーゼである、請求項1記載の製造法。

【請求項5】 合成目的の核酸関連物質の製造に不可欠な酵素の遺伝子が大腸菌由来のものであり、形質転換に用いる宿主細胞も大腸菌である、請求項1記載の製造法。

【請求項6】 下記の工程から調製される、核酸関連物質の酵素的製造法に使用する酵素調製物。

(A) 合成目的の核酸関連物質の製造に不可欠な酵素の遺伝子をクローニングし、該遺伝子の発現が高効率で起こるように適当な発現制御シグナルと連結して発現ベクターを構築する工程；

(B) A工程で得られたベクターを用いて微生物を形質転換する工程；

(C) B工程で得られた形質転換体を当該微生物が増殖可能な培地中で増殖させ、さらにクローニングした酵素の遺伝子の発現を誘導して合成目的の核酸関連物質の製造に不可欠な酵素が菌体内に大量に蓄積するまで培養を行う工程；および

(D) C工程で培養を終えた菌体を回収し、合成目的の核酸関連物質の製造に不可欠な酵素を抽出、精製して酵

素調製物を調製する工程

【請求項7】 合成目的の核酸関連物質がポリヌクレオチドであり、該核酸関連物質の製造に不可欠な酵素がポリヌクレオチドホスホリラーゼである、請求項6記載の酵素調製物。

【請求項8】 合成目的の核酸関連物質がイノシンまたはその誘導体であり、該核酸関連物質の製造に不可欠な酵素がアデノシンデアミナーゼである、請求項6記載の酵素調製物。

【請求項9】 合成目的の核酸関連物質が2', 3'-ジデオキシイノシンであり、該核酸関連物質の製造に不可欠な酵素がアデノシンデアミナーゼである、請求項6記載の酵素調製物。

【請求項10】 合成目的の核酸関連物質の製造に不可欠な酵素の遺伝子が大腸菌由来のものであり、形質転換に用いる宿主細胞も大腸菌である、請求項6記載の酵素調製物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、核酸関連物質を酵素的に製造する方法であって、組換えDNA手法により合成目的の核酸関連物質の製造に不可欠な酵素を微生物内で大量に調製し、該微生物から得られる酵素調製物を用いる核酸関連物質の製造法、及びその製造法に使用する酵素調製物に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 アデニン、グアニン、ウラシル、チミン、ヒポキサンチン、アデノシン、グアノシン、イノシン、チミジン、ウリジン、アデニル酸、イノシン酸、グアニル酸、ADP、ATP、3'-アジドチミジン(AZT)、2', 3'-ジデオキシイノシン(DDI)、2', 3'-ジデオキシアデノシン(DDA)、3'-デオキシ-2', 3'-ジデヒドロチミジン(DHT)、9-(β-D-アラビノフラノシル)アデニン(araA)、ポリイノシン酸(poly I)、ポリシチジル酸(poly C)、ポリアデニル酸(poly A)などの化合物に代表される核酸関連物質は、種々の生理活性物質の合成原料として重要であるばかりでなく、それ自体医薬品として開発され、既に市販されているものもある。このため、核酸関連物質を工業的な規模で大量に収率よく製造する方法を確立することは産業上極めて有益であり、この方面の研究も数多く報告されている。たとえば、ポリヌクレオチドとDDIとを例に挙げ、現在まで報告された研究の概要を説明する。

【0003】 A. ポリヌクレオチド

ポリヌクレオチドは、1955年にオチアヨらにより初めて実験室的に合成され、その後この物質が種々の生理活性を有することが明らかとなった。特に、インターフェロン産生誘導能の証明は、この物質の医薬品としての開発を加速させた。ポリヌクレオチドの合成法として

は、化学的方法と酵素的の方法の2種類の 방법이考えられる。しかし、ポリヌクレオチドはモノヌクレオチドの重合体であるため、現在の技術レベルから考えて経済的な大量製造に化学的合成法を適用することは困難である。

【0004】また、ポリヌクレオチドを酵素的に合成する際に使用するポリヌクレオチドホスホリラーゼは微生物に広く存在することが知られており、ポリヌクレオチド合成時に使用する酵素調製物としては微生物由来のものをを用いるのが有利である。このため、ポリヌクレオチドの工業的製造に適した微生物のスクリーニングが多く
10 の研究者によって行われた。たとえば、1975年に六川らは、ヌクレアーゼ、ヌクレオシドニリン酸分解酵素などのポリヌクレオチド合成阻害酵素の活性が微弱でポリヌクレオチドホスホリラーゼ活性の比較的高い菌株、*Achromobacter* sp. KRI70-4 を見だし、これを報告している (*Agric. Biol. Chem.*, 39, 1455(1975))。しかしながら、該菌株は、ポリヌクレオチドホスホリラーゼの生産性が低く、ポリヌクレオチドの工業的製造に応用
20 できるような最適な酵素源とはなり得ない。また、該菌株より調製した酵素を用いてポリウリジル酸やポリグアニル酸を合成することは困難であった。

【0005】大腸菌のポリヌクレオチドホスホリラーゼは基質特異性が広く、種々のポリヌクレオチド合成に有用であることが知られている。しかし、該酵素の菌体内における存在量は極めて少なく、ポリヌクレオチド合成阻害酵素も酵素抽出液中にかなり混在するため、ポリヌクレオチドの製造に好適な高度に精製されたポリヌクレオチドホスホリラーゼを大量に調製することは困難であ
30 った。このような理由から、大腸菌由来のポリヌクレオチドホスホリラーゼを用いてポリヌクレオチドを工業的に大量に製造しようとする試みは行われていない。

【0006】Portier らは大腸菌ポリヌクレオチドホスホリラーゼをコードする *pnp* 遺伝子のプラスミドへのクローニングを行い、ポリヌクレオチドホスホリラーゼの生産量の増大を試みた結果、親株の約10~20倍程度のポリヌクレオチドホスホリラーゼの生産性の向上が認められたことを報告している (*Chem. Abst.*, 99, 51863k (1982))。しかし、この程度生産量を上昇させたとしてもポリヌクレオチドの製造において従来法では得られない技術上のメリットをもたらすものではなく、また、
40 この組換え菌から酵素標品を調製する簡便な手法が確立されていないなどの理由により、組換え菌を用いたポリヌクレオチドの製造法は実用化までには至っていない。

【0007】B. DDI

DDI は、強い坑ウイルス活性を有し、インフルエンザウイルス、エイズウイルスなどに起因するウイルス性疾患の治療薬として期待されている。2', 3'-ジデオキシヌクレオシドを合成する方法としては、化学的な合成法と酵素的な合成法の2種類の 방법이知られている。化学的な合成法は、反応工程が長かったり、合成収率が
50

低いといった問題点を有し、必ずしも満足できる方法ではない。また、酵素的合成法としては、たとえば、微生物菌体中のヌクレオシドホスホリラーゼを用いてDDI、DDAなどの2', 3'-ジデオキシヌクレオシドを製造する方法が知られている (特開昭62-149893号) が、DDIの合成収率が低いという欠点を有していた。

【0008】この欠点を克服するため、動物臓器由来のアデノシンデアミナーゼを用いて、比較的収率よく調製
10 できるDDAをDDIに変換する試みもなされている (Webb II, R. R., et al., *Nucleoside and Nucleotide* s, 7, 147(1988); Beach, C. M., et al., *Nucleoside and Nucleotides*, 10, 1499 (1991)) が、酵素源が動物であるため供給量およびコスト面での問題が残る。また、DDAをDDIに変換する活性を有する微生物を培養し、その洗浄生菌体を用いてDDAをDDIに変換する
20 方法も報告されているが (特開平2-291291号)、大量の生菌体を必要とするなど、工業レベルでのDDIの製造に最適なものではなかった。

【0009】また、微生物菌体からアデノシンデアミナーゼを抽出し、これをDDAからDDIに変換する反応に適用しようとしても、該酵素の菌体内における存在量は極めて少なく、得られる粗酵素液にはアデノシンデアミナーゼのほかにヌクレオシダーゼ、ヌクレオシドホスホリラーゼなどの副反応を触媒する酵素も含有されているため、DDIの製造に好適な高度に精製されたアデノシンデアミナーゼを大量に調製することは困難であった。

【0010】

【本発明が解決しようとする課題】上述のように、核酸関連物質を酵素的に製造しようとする場合、合成目的の核酸関連物質の種類に関係なく、(1) 菌体内に存在する合成目的の核酸関連物質の製造に不可欠な酵素の量が十分でない、(2) 微生物から抽出した粗酵素液には好ましくない副反応を触媒する酵素がかなり混在し、このままでは酵素調製物として使用できない、(3) 核酸関連物質の製造に不可欠な酵素は菌体内酵素である場合がほとんどであり、これらの酵素を高度に精製するのが非常に困難である、などの共通する問題を有し、核酸関連物質を大量に製造する方法として必ずしも満足できるものではなかった。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上述した核酸関連物質の酵素的製造法に共通する問題を克服し、核酸関連物質を工業的に大量に製造する方法を開発すべく鋭意研究を行った。その結果、組換えDNA手法を用いて合成目的の核酸関連物質の製造に不可欠な酵素を人為的に大量発現させることにより宿主微生物内に目的の酵素を大過剰に蓄積させ、この形質転換体から簡便な方法で核酸関連物質の製造に好適な酵素調製物を大量に調製できることを発見した。さらに、このようにして得た

酵素調製物を核酸関連物質の製造に用いると、極めて収率よく、かつ短時間に目的とする核酸関連物質を合成できることを知見し、本発明を完成させた。

【0012】したがって、本発明は下記の工程からなる核酸関連物質の酵素的製造法に関するものである。

(A) 合成目的の核酸関連物質の製造に不可欠な酵素の遺伝子をクローニングし、該遺伝子の発現が高効率で起こるように適当な発現制御シグナルと連結して発現ベクターを構築する工程；

(B) A工程で得られたベクターを用いて微生物を形質転換する工程；

(C) B工程で得られた形質転換体を当該微生物が増殖可能な培地中で増殖させ、さらにクローニングした酵素の遺伝子の発現を誘導して合成目的の核酸関連物質の製造に不可欠な酵素が菌体内に大量に蓄積するまで培養を行う工程；

(D) C工程で培養を終えた菌体を回収し、合成目的の核酸関連物質の製造に不可欠な酵素を抽出、精製して酵素調製物を調製する工程；および

(E) D工程で得られた酵素調製物を用いて合成目的の核酸関連物質を製造する工程

【0013】また、本発明は下記の工程から調製される、核酸関連物質の酵素的製造法に使用する酵素調製物に関するものである。

(A) 合成目的の核酸関連物質の製造に不可欠な酵素の遺伝子をクローニングし、該遺伝子の発現が高効率で起こるように適当な発現制御シグナルと連結して発現ベクターを構築する工程；

(B) A工程で得られたベクターを用いて微生物を形質転換する工程；

(C) B工程で得られた形質転換体を当該微生物が増殖可能な培地中で増殖させ、さらにクローニングした酵素の遺伝子の発現を誘導して合成目的の核酸関連物質の製造に不可欠な酵素が菌体内に大量に蓄積するまで培養を行う工程；および

(D) C工程で培養を終えた菌体を回収し、合成目的の核酸関連物質の製造に不可欠な酵素を抽出、精製して酵素調製物を調製する工程

【0014】本明細書において、「核酸関連物質」とはある特定の化合物を指称するものではなく、核酸塩基、ヌクレオシド、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、およびそれらの化合物から誘導されることが知られている、あるいはこれから知られるであろう化合物群を総称したものである。また、「核酸関連物質の製造に不可欠な酵素」とは、たとえばアデノシンデアミナーゼ、ポリヌクレオチドホスホリラーゼ、ヌクレオシドホスホリラーゼ、ヌクレオシダーゼ、ヌクレオシドオキシダーゼなどのように核酸関連物質に作用して他の化合物に変換することのできる酵素を総称したものである。

【0015】本発明の方法を実施するに際し、合成目的

の核酸関連物質、その製造に不可欠な酵素及び原料化合物の最適な組合せを設定することが必要である。たとえば、合成目的の核酸関連物質がポリヌクレオチドの場合、ポリヌクレオチドの製造に不可欠な酵素と原料化合物はポリヌクレオチドホスホリラーゼとヌクレオシド二りん酸になる。また、合成目的の核酸関連物質がDDIの場合、DDIの製造に不可欠な酵素としてアデノシンデアミナーゼを使用すれば、原料化合物はDDAとなり、酵素としてヌクレオシドホスホリラーゼを使用すれば、原料化合物はヒポキサンチンと2', 3'-ジデオキシヌクレオシドもしくは2, 3'-ジデオキシリボース-1-りん酸となる。このように、合成目的の核酸関連物質、その製造に不可欠な酵素、及び原料化合物の三者を照らし合わせて最も合理的な組合せを合目的的に選択すればよい。

【0016】以下、本発明方法を工程順に説明する。

1. A工程

A工程は、合成目的の核酸関連物質の製造に不可欠な酵素の遺伝子をクローニングし、該遺伝子の発現が高効率で起こるように適当な発現制御シグナルと連結して発現ベクターを構築する工程である。遺伝子をクローニングする際の対象微生物は特に限定されないが、後述のB工程で宿主として使用する微生物と同じものを対象にする、いわゆるセルフクローニングが本発明では有利である。酵素をコードする遺伝子が既にクローン化され、その一次構造が明らかとなっている場合、該遺伝子の塩基配列と相補的な塩基配列を持つオリゴデオキシヌクレオチドを合成し、それをプローブとして、微生物の染色体から常法により当該酵素の遺伝子をクローン化することができる。また、ポリメラーゼ連鎖反応（以後、PCRと略称する）によりクローン化することも可能である。さらに、報告されたDNA塩基配列に基づき該遺伝子を化学的に合成することもできる。酵素をコードする遺伝子の一次構造が不明な場合であっても、必要により酵素のアミノ酸配列の一部を既知の方法で求め、部分的なアミノ酸配列に相当する塩基配列を明らかにすることにより、一次構造が知られている場合と同様に酵素の遺伝子をクローン化することができる。

【0017】クローン化した酵素の遺伝子は、酵素の発現の人為的制御が可能となるように発現制御シグナル（転写開始シグナルおよび翻訳開始シグナル）とベクター上で連結する。本発明者らは、発現量の上昇と後述のD工程における酵素精製の容易さとの関連に関して研究した結果、親株より50倍以上、好ましくは100倍以上発現量を上昇させることにより、後述するようにD工程における酵素の精製が極めて容易になることを見いだした。したがって、発現制御シグナルとしてはクローン化した酵素遺伝子由来の発現制御シグナルを使用することも可能であるが、酵素遺伝子の発現量を飛躍的に上昇させるような強力な転写開始ならびに翻訳開始シグナル

を用いることが望ましい。このような発現制御シグナルとしては、宿主として大腸菌を用いる場合には、lac プロモーター、trp プロモーター、tac プロモーター (de r Boer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 21 (1983); Russell and Bennett, Gene, 20, 231 (1982)) などを、宿主として酵母を用いる場合には、グリセルアルデヒド-3-ホスフェート-デヒドロゲナーゼ (J. Biol. Chem., 254, 9837 (1979))、3-ホスホグリセレートキナーゼ (J. Biol. Chem., 255, 2073 (1980)) および抑制性酸性ホスファターゼ (Nucl. Acids Res., 11, 1657 (1983)) に対するプロモーターなどを例示することができる。

【0018】ベクターとしては、種々のプラスミドベクター、ファージベクターなどが使用可能であるが、微生物菌体内で複製可能であり、特定の制限酵素切断部位を有し、菌体内のコピー数の高いプラスミドベクターを使用するのが望ましい。具体的に宿主として大腸菌を使用する場合には、pBR322 (Boliver et al., Gene, 2, 95 (1975))、pUC18、pUC19 (Messing, J., Methods in Enzymology, 101, 20 (1983)) などが例示することができる。また、酵母を宿主とする場合には、YEp13 (ATCC 37115)、YEp24 (ATCC 37051) などを例示することができる。酵素遺伝子のクローニング、クローニングした遺伝子と発現制御シグナルの連結および融合DNAをベクターに挿入する方法は、一般の技術者、特に分子生物学、遺伝子工学の分野に属する技術者にとっては周知の技術であり、具体的には、例えば「Molecular Cloning」(Maniatisら編、Cold Spring Harbor, New York (1982)) に記載の方法に従って行うことができる。

【0019】2. B工程

B工程はA工程で得られたベクターを用いて微生物を形質転換する工程である。B工程で使用する微生物としては、安全性が高く扱いやすいものであれば、特に限定されない。たとえば、大腸菌、酵母などDNA組換え操作に常用されている微生物を使用することができる。その中でも、大腸菌が取扱い上有利であり、たとえば組換えDNA実験に使用されるC600菌、JM105菌、JM105菌、MC1061菌などが使用可能である。微生物を形質転換する方法は既に多くの方法が報告されており、宿主として使用する微生物の種類に応じて適宜選択すればよい。たとえば大腸菌を宿主として使用する場合は、低温下、塩化カルシウム処理して菌体内にプラスミドを移入する方法 (Mandel and Higa, J. Mol. Biol., 53, 159 (1970)) により、大腸菌を形質転換することができる。また、酵母を宿主として使用する場合には、プロトプラスト法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978))、アルカリ金属処理法 (J. Bacteriol., 153, 163 (1983)) などの方法を採用することができる。

【0020】3. C工程

C工程は、B工程で得られた形質転換体を当該微生物が

増殖可能な培地中で増殖させ、さらにクローニングした酵素の遺伝子の発現を誘導して菌体内に該酵素が大量に蓄積するまで培養を行う工程である。形質転換体の培養は、炭素源、窒素源などの微生物の増殖に必要な栄養源を含有する培地を用いて常法に従って行えばよい。たとえば、宿主として大腸菌を使用した場合、培地としては2xYT培地 (Messing, J., Method in Enzymology, 100, 20 (1983))、LB培地、M9CA培地 (Maniatisら、Molecular Cloning、前述) などの大腸菌の培養に常用されている培地を用い、20~40℃の培養温度で必要により通気、攪拌しながら培養することができる。また、ベクターとしてプラスミドを用いた場合には、培養中におけるプラスミドの脱落を防ぐために適当な抗生物質 (プラスミドの薬剤耐性マーカーに依り、アンピシリン、テトラサイクリンなど) の薬剤を適当量培養液に加えて培養する。

【0021】培養中に酵素遺伝子の発現を誘導する必要がある場合には、用いたプロモーターで常用されている方法で酵素の発現を誘導する。たとえば、lac プロモーターやtac プロモーターを使用した場合には、培養中期に発現誘導剤であるイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (以下、IPTGと略称する) を適当量培養液に添加する。また、使用するプロモーターが構成的に転写活性を有する場合には、特に発現誘導剤を添加する必要はない。酵素遺伝子の発現を誘導した後、酵素遺伝子産物 (合成目的の核酸関連物質の製造に不可欠な酵素) を菌体内に大量に蓄積させるため、さらに数時間培養を継続する。

【0022】4. D工程

D工程は、C工程で培養を終えた菌体を回収し、合成目的の核酸関連物質の製造に不可欠な酵素を抽出、精製して酵素調製物を調製する工程である。上述したように本発明の方法においては目的の酵素が微生物菌体内に過剰量生産されているため、培養して得られた菌体からの目的とする酵素の調製は極めて簡単である。たとえば、回収した菌体を適当な緩衝液に懸濁し、超音波処理、フレンチプレス処理などの方法により物理的に菌体を破壊し、菌体残渣を除去して得た無細胞抽出液そのものを酵素調製物として使用することもできる。さらに精製が必要とされる場合であっても、硫酸アンモニウムによる塩析処理、透析処理、エタノールなどの溶媒処理、各種クロマトグラフィー処理などの酵素に精製に通常使用されている処理を単独で、またはせいぜい2種類の処理を組み合わせただけの簡便な手段で核酸関連物質の合成に好適な高度に精製された (90%以上) 酵素調製物を調製することができる。

【0023】5. E工程

E工程は、D工程で得られた酵素調製物を用いて合成目的の核酸関連物質を製造する工程である。核酸関連物質の合成は、使用する酵素の最適条件を予備試験により設

定し、この条件下で原料化合物と酵素を反応させることにより実施することができる。たとえば、大腸菌のポリヌクレオチドホスホリラーゼを用いるポリヌクレオチドを合成は、反応温度0~70℃、反応pH7~12、マグネシウムイオン、マンガンイオン、コバルトイオン、亜鉛イオンなどの二価陽イオン濃度0.1~50mMの範囲内から適宜最適条件を選択し、適当な緩衝液にヌクレオシド二りん酸（原料化合物）、二価陽イオンおよび酵素調製物を添加し、設定した条件下で反応させることにより行うことができる。反応終了後、合成された核酸関連物質は、核酸関連物質の精製法として通常使用されている方法を適宜組み合わせ、精製分離する。

【0024】

【発明の効果】本発明は、組換えDNA手法を用いて目的とする酵素を微生物菌体内に過剰量蓄積せしめることにより、簡便な方法で高度に精製された酵素調製物の大量調製を初めて可能にしたものである。このようにして得た酵素調製物は、簡便な精製手段であるにもかかわらず、高度に精製されたものである。また、酵素調製物中に副反応を触媒する酵素が存在していたとしても、目的とする酵素と副反応を触媒する酵素との存在比が格段に相違するため、核酸関連物質の合成になんら悪影響を及ぼさない。したがって、核酸関連物質の合成に好適な酵素調製物を調製するために従来のような煩雑な精製操作を全く必要としない。このように、本発明は、核酸関連物質の工業的な大量製造を初めて実用化するものであって、産業上、きわめて有益なものである。

【0025】

【実施例】以下、ポリヌクレオチドホスホリラーゼを用いたポリヌクレオチドの合成とアデノシンデアミナーゼを用いたDDIの合成の2種類の実施例をあげ、本発明を具体的に説明する。また、本実施例におけるDNAの調製、制限酵素による切断、T4DNAリガーゼによるDNA連結、並びに大腸菌の形質転換法は全て「Molecular Cloning」(Maniatisら編、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1982))に従って行った。また、制限酵素 BamHI、AmpliTaq DNAポリメラーゼ、T4DNAリガーゼ、並びにクローニングベクター pUC18は全て宝酒造(株)より入手した。

【0026】実施例1；ポリヌクレオチドホスホリラーゼを用いたポリヌクレオチドの製造

(1) 大腸菌ポリヌクレオチドホスホリラーゼをコードする pnp遺伝子のクローニングと発現ベクターpDR-PNPの構築

大腸菌 K12株C600菌(工業技術院微生物工業研究所寄託、第8037号)の染色体DNAを斎藤と三浦の方法(Biochim. Biophys. Acta., 72, 619(1963))で調製した。このDNAをテンプレートとして、以下に示す2種類のプライマーDNAを合成し、PCR法により大腸菌 pnp遺伝子を増幅した。プライマーDNAは、Gene Ass

embler Plus DNA synthesizer (Pharmacia 社)を用いて、GeneAssembler Plus Owner's Manual (Pharmacia 社)に従って合成、精製した。

【0027】

【化1】プライマー(A)；5'-ACAGGATCCTACATTGCTTAATCCGATCGT-3'

プライマー(B)；5'-TATGGATCCTAACAAGGCGTCCTGCCCCGT-3'

【0028】PCRによる pnp 遺伝子を増幅は、反応液100μl中[50mM塩化カリウム、10mMトリス-塩酸(pH8.3)、1.5mM塩化マグネシウム、0.001%ゼラチン、テンプレートDNA 0.1μg、プライマーDNA(A)(B)各々1.0μM、デオキシヌクレオチド三りん酸(dATP、dCTP、dGTP、dTTP)各々0.2mM、AmpliTaq DNAポリメラーゼ2.5ユニット]をPerkin-Elmer Cetus Instrument 社製DNA Thermal Cyclerを用いて、熱変性(94℃、1分)、アニーリング(55℃、2分)、ポリメライゼーション(72℃、3分)のステップを25回繰り返すことにより行った。遺伝子増幅後、反応液をフェノール/クロロホルム(1:1)混合液で処理し、水溶性画分に2倍量のエタノールを添加しDNAを沈澱させた。沈澱回収したDNAを文献(Molecular Cloning, 前述)の方法に従ってアガロースゲル電気泳動により分離し、2.2kb相当のDNA断片を精製した。該DNAを制限酵素 BamHIで切断し、制限酵素 BamHIで切断したプラスミドpDR540(Russell and Bennett, Gene, 20, 231 (1982): Pharmacia 社より入手)とT4DNAリガーゼを用いて連結した。連結反応液を用いて大腸菌JM105菌(Pharmacia 社より入手)を形質転換し、得られたアンピシリン耐性形質転換体よりプラスミド pDR-PNPを調製した。pDR-PNPは、プラスミドpDR540の tacプロモーター下流の BamHI切断部位に大腸菌 pnp 遺伝子を含む BamHI DNA断片がその転写方向が tacプロモーターと一致して挿入されたものである(図1参照)。

【0029】(2) 大腸菌ポリヌクレオチドホスホリラーゼの大量調製

プラスミドpDR-PNPを保持する大腸菌JM105菌を、100μg/mlのアンピシリンを含有する2xYT培地500mlに植菌し、37℃で振とう培養した。4x10⁸菌/mlに達した時点で、培養液に集濃度1mMになるようにIPTGを添加し、さらに37℃で24時間振とう培養を続けた。培養終了後、遠心分離(9000g、10分)により菌体を回収し、60mlの緩衝液(50mMトリス塩酸(pH7.8)、5mM塩化マグネシウム、10mM 2-メルカプトエタノール)に菌体を懸濁した。菌体懸濁液を超音波処理することで、菌体を破壊し遠心分離(20000g、10分)により菌体残渣を除去した。このようにして得られた上清画分を

菌体抽出液とした。菌体抽出液におけるポリヌクレオチドホスホリラーゼ活性を対照菌 (pDR540を保持する大腸菌JM105 菌) と共に下記表に示す。尚、ポリヌクレオチドホスホリラーゼ活性 (イノシン二りん酸のポリメライゼーション活性) は、六川らの方法 (Agric. Biol. Chem., 39, 1455 (1975)) に従って測定した。ただし、反応液組成は50mMトリス塩酸 (pH9.0)、9mM*

*塩化マグネシウム、36mMイノシン二りん酸に変更した。下記表から明らかなように、発現ベクター pDR-PNP 保持菌からは対照菌の100倍以上のポリヌクレオチドホスホリラーゼの生産が確認された。

【0030】

【表1】

菌/プラスミド	ポリヌクレオチドホスホリラーゼ活性
JM105/pDR540	0.02 (ユニット/mg蛋白質)
JM105/pDR-PNP	3.17

1ユニット=1 μ mole IDP polymerized/分 (at 37℃)

【0031】得られた菌体抽出液に23gの硫酸アンモニウムを加え、塩析した画分を遠心分離 (20000g、15分) により回収し、さらに緩衝液 (50mMトリス塩酸 (pH7.8)、5mM塩化マグネシウム、1mM 2-メルカプトエタノール) に懸濁し、同じ組成の緩衝液に対して1晩透析した。この透析内液を粗酵素調製物とした。粗酵素調製物は、次に50mMトリス塩酸 (pH7.8)、5mM塩化マグネシウム、10mM 2-メルカプトエタノール、5%グリセロールで平衡化したDEAEセファデックスA-50 (Pharmacia 社より入手) カラム (25mm diameter x 250 mm) に適し、吸着した酵素を塩化ナトリウムを0.1~0.4M含む同一組成の緩衝液を用いたりニアグラジエント法で溶出した。溶出した活性画分 (44ml) を集め、30gの硫酸アンモニウムを加えた。塩析した画分を先と同様遠心分離 (20000g、15分) により回収し、さらに緩衝液 (50mMトリス塩酸 (pH7.8)、5mM塩化マグネシウム、1mM 2-メルカプトエタノール、5%グリセロール) に懸濁し、同じ組成の緩衝液に対して1晩透析し、最終的な酵素調製物 (900ユニット) を得た。

【0032】 (3) ポリヌクレオチドの合成

A. poly Iの合成

イノシン二りん酸三ナトリウム塩5.3g、塩化マグネシウム0.54gを50mM トリス塩酸 (pH9.0) 300mlに溶解し、50ユニットの上記酵素調製物 (大腸菌ポリヌクレオチドホスホリラーゼ) を加え、32℃で3時間合成反応を行わせた (合成率50%)。反応終了後、冷エタノールを加え poly Iを沈澱させた。常法により poly Iを精製したところ、S値13.0の高分子poly Iを1.83g得た。

【0033】 B. poly A, poly C, poly G及びpoly Uの合成

上記粗酵素調製物を用いて、下記表に示す基質及び二価陽イオンを含有する50mMトリス塩酸 (pH9.0) 緩衝液中、表に示した酵素量および反応温度で3時間反応させ、poly A, poly C, poly G及びpoly Uを合成した。下記表に示されているように、いずれのホモポリヌクレオチドも40%以上の高い効率で合成され、ヌクレアーゼなどの共雑酵素によってもたらされる化合物は全く検出されなかった。

【0034】

【表2】

	基 質	二価陽イオン	合成温度 (℃)	酵素量 (ユニット/ml)	合成率 (%)
poly A	24mM ADP	5mM	37	0.33	71.6
poly C	24mM CDP	17mM	37	0.33	50.1
poly G	24mM GDP	3mM	65	0.33	86.3
poly U	24mM UDP	11mM	45	0.33	42.3

註 Mg²⁺; poly A, poly Cおよびpoly U

【0035】実施例2；アデノシンデアミナーゼを用いたDDIの製造

(1) 大腸菌アデノシンデアミナーゼをコードする add 遺伝子のクローニングと発現ベクターpDR-addの構築
大腸菌 K12株C600菌（工業技術院微生物工業研究所寄託、第8037号）の染色体DNAを斎藤と三浦の方法（Biochim. Biophys. Acta., 72, 619 (1963)）で調製した。このDNAをテンプレートとして、以下に示す2種類のプライマーDNAを合成し、PCR法により大腸菌 add 遺伝子を増幅した。プライマーDNAは、Gene Assembler Plus DNA synthesizer（Pharmacia 社）を用いて、GeneAssembler Plus Owner's Manual（Pharmacia 社）に従って合成、精製した。

【0036】

【化2】プライマー（A）；5'-TAGGATCCACCATGATTGATACACCTG-3'

プライマー（B）；5'-AAGGATCCTTTGTGCTTGCATGAAAAAT-3'

【0037】PCRによる add 遺伝子を増幅は、反応液 100 μ l 中 [50 mM 塩化カリウム、10 mM トリス-塩酸 (pH 8.3)、5 mM 塩化マグネシウム、0.001 %ゼラチン、テンプレートDNA 0.1 μ g、プライマー（A）（B）それぞれ1.0 μ M、デオキシヌクレオチド三リン酸（dATP, dCTP, dGTP, dTTP）それぞれ0.2 mM、AmpliQ DNAポリメラーゼ2.5ユニット]をPerkin-ElmerCetus Instrument 社製 DNA Thermal Cycler を用いて、熱変性（94℃、1分）、アニーリング（55℃、2分）、ポリメライゼーション（72℃、3分）のステップを25回繰り返すことにより行った。遺伝子増幅終了後、反応液をフェノール/クロロホルム（1：1）混合液で処理し、水溶性画分に2倍量のエタノールを添加しDNAを沈澱させた。沈澱回収したDNAを文献（Molecular Cloning、前述）の方法に従ってアガロースゲル電気泳動により分離し、1.0 kb相当のDNA断片を精製した。該DNAを制限酵素 BamHIで切断し、制限酵素 BamHIで切断したプラスミド pDR540 DNA（Russell and Bennet, Gene, 20, 231 (1982)；Pharmacia 社より入手）とT4 DNAリガーゼを用いて連結した。連結反応液を用いて大腸菌JM109 * 40

*（宝酒造（株）より入手）を形質転換し、得られたアンピシリン耐性形質転換体よりプラスミド pDR-addを調製した。pDR-add は、プラスミド pDR540 の tacプロモーター下流の BamHI切断部位に大腸菌 add 遺伝子を含有する BamHI DNA断片がその転写方向が一致して挿入されたものである（図2参照）。

【0038】（2）組換え大腸菌アデノシンデアミナーゼの調製

10 プラスミド pDR-addを保持する大腸菌 JM109菌を、100 μ g/mlのアンピシリンを含有する2xYT培地100 mlに植菌し、37℃で振とう培養した。4x10⁸ 菌/mlに達した時点で培養液に終濃度1 mMになるようにイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシドを添加し、さらに7時間、37℃で振とう培養を続けた。培養終了後、遠心分離（8000 g、10分）により菌体を回収し、20 mlの緩衝液（20 mM トリス-塩酸 (pH 8.2)、10 %エチレングリコール、1 mM フェニルメチルスルフォニルフルオリド(PMSF)）に菌体を懸濁した。菌体懸濁液を超音波処理することで菌体を破壊し、遠心分離（12,000 g、10分）により菌体残査を除去した。回収した無細胞抽出液は、緩衝液（10 mM トリス-塩酸 (pH 8.2)、1 %エチレングリコール、2 mM CaCl₂、0.05 mMエチレンジアミン四酢酸）に対して一晩透析した。この透析内液を酵素調製物とした。酵素調製物におけるアデノシンデアミナーゼをNygaardらの方法（Methods Enzymol., 51, 508 (1987)）に従って測定した。また、2', 3'-ジデオキシアデノシンデアミナーゼ活性もNygaardらの方法を改変して測定した。すなわち、基質として2', 3'-ジデオキシアデノシンを用い、さらに反応液と等量の0.1 N NaOHを添加することで反応を停止させた。測定結果を下記表に示す。発現ベクター pDR-addを保持する菌からの酵素調製物は、対照菌株（pDR540を保持する大腸菌 JM109菌）の200倍以上のアデノシンデアミナーゼおよび2', 3'-ジデオキシアデノシンデアミナーゼ活性が検出された。

【0039】

【表3】

菌/プラスミド	アデノシンデアミナーゼ活性	2',3'-ジデオキシアデノシンデアミナーゼ活性
JM109/pDR540	186 エット/mg蛋白	4 エット/mg 蛋白
JM109/pDR-add	44,646	4,882

1 エット = 1 nmole deamination/分 at 37℃

【0040】（3）大腸菌アデノシンデアミナーゼを用いたDDAからのDDIへの変換

10 ml の緩衝液 (25 mM トリス-コハク酸 (pH 7.6)) に 4.7 mg の DDA を溶解し、上記酵素調製物 (アデノシンデアミナーゼ 8710 ユニット、粗酵素蛋白質量 200 μ g; 1 ユニット = 1 nmol イノシン生成/分) を添加し、37℃ で 30 分間反応させた。反応終了後、常法により高速液体クロマトグラフィーで反応液中の DDI を定量したところ、DDA は完全に DDI に変換されていた。また、アデニン並びにイノシンの生成は認められなかった。

【0041】 (4) プラスミド pDR-add 保持菌を用いた DDA から DDI への変換
本発明で造成された大腸菌アデノシンデアミナーゼ生産株 (JM105[pDR-add]、JM105 菌は Pharmacia 社より入手) を用いて DDA から DDI への微生物変換を横関ら

の方法 (特開平 2-291291) に従って行った。但し、菌体は IPTG 添加培養後 5 時間の菌体を用いた。また、プラスミド pDR540 を保持する大腸菌 JM105 菌を対照とした。その結果、対照菌においては、反応 40 分後に 6.2 mg/dl、反応 90 分後に 9.0 mg/dl の DDI が生成した。一方、JM105[pDR-add] 菌においては、反応 2 分後に 9.2 mg/dl の DDI が生成した。

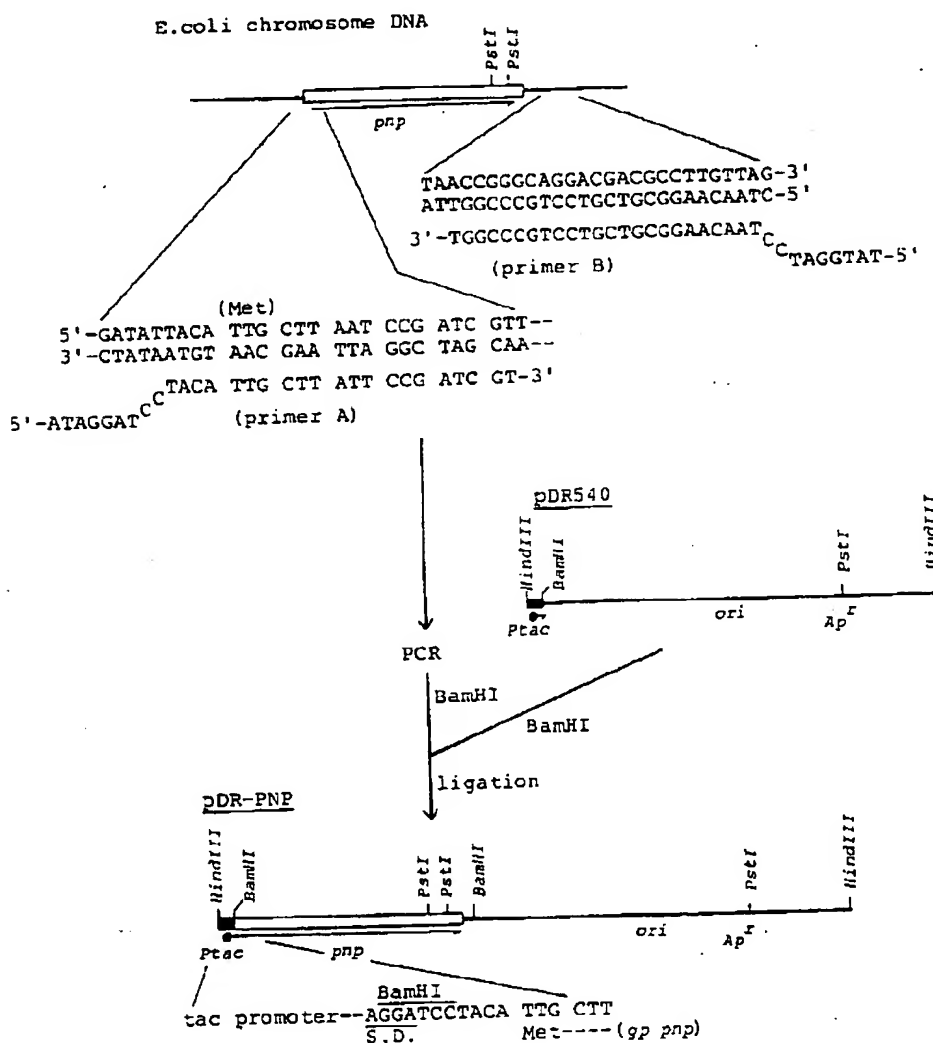
【0042】

【図面の簡単な説明】

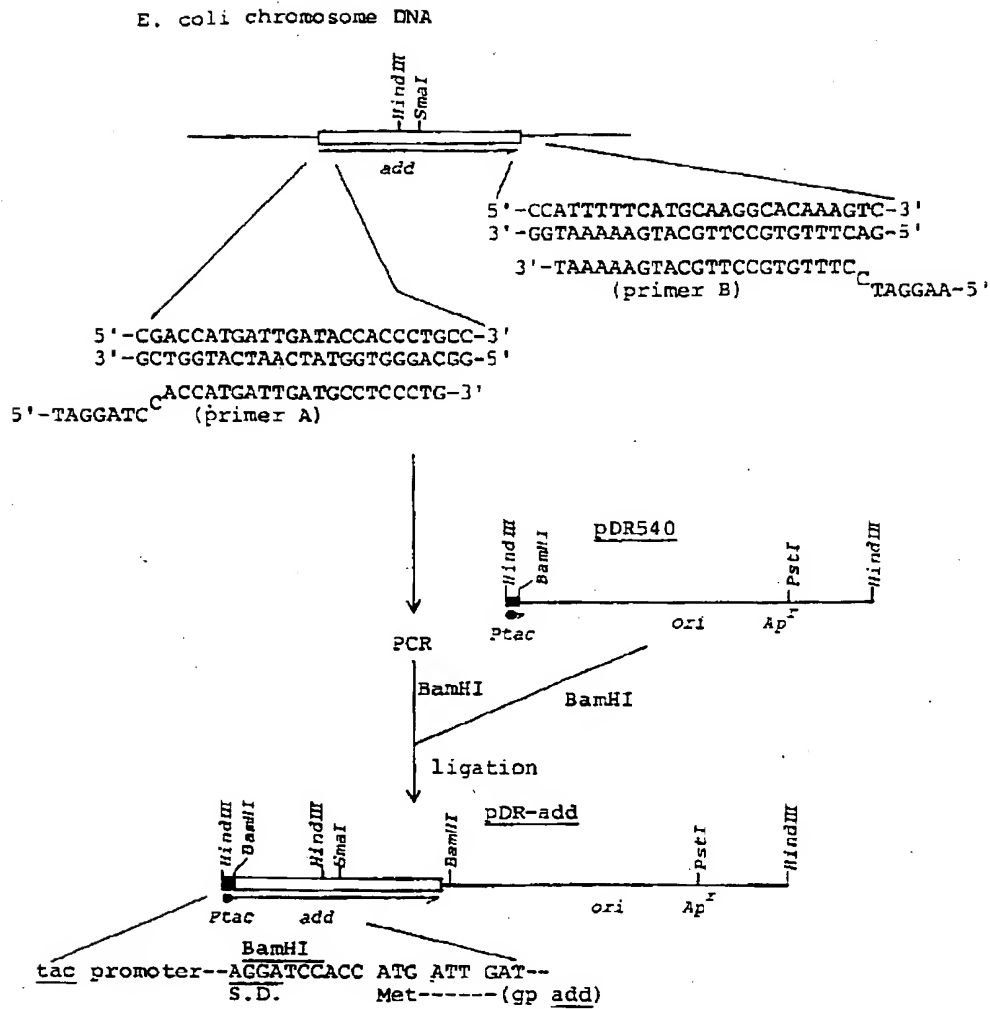
【図 1】 図 1 は、発現ベクター pDR-PNP の構築法を示す。

【図 2】 図 2 は、発現ベクター pDR-add の構築法を示す。

【図 1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁵

識別記号

片内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 N 15/55

C 1 2 P 19/40

7432-4B

// (C 1 2 N 9/12

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 N 9/78

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 N 15/54

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 N 15/55

C 1 2 R 1:19)